«Паразитология», вып. 1, 1999

VII МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО КОКЦИДИЯМ, 1—5 сентября 1997 г., Оксфорд, Англия

Кокцидии — облигатные внутриклеточные паразиты, относящиеся к типу Apicomplexa, классу Sporozoa. Многие кокцидии вызывают опасные болезни животных и человека, в том числе СПИД-ассоциированные (оппортунистические) инфекции — токсоплазмоз, криптоспоридиоз, циклоспороз.

Этим во многом объясняется интерес к изучению кокцидий со стороны специалистов в области как фундаментальной, так и прикладной науки (медицины, ветеринарии). Несмотря на значительный материальный ущерб, причиняемый кокцидиозами народному хозяйству, в нашей стране изучению кокцидий уделяется недостаточное внимание, что резко контрастирует с ситуацией за рубежом, где исследования по кокцидиям ведутся не только достаточно интенсивно и экстенсивно, но и с применением самых современных методов, включая методы молекулярной биологии. Более того, каждые 4 года в разных странах мира организуются международные конференции по кокцидиям, ставшие своеобразным смотром сил в этой важной области исследований. В 1997 г. в Оксфорде состоялась уже седьмая Международная конференция. К последним двум конференциям было приурочено издание специальных буклетов — Международных справочников, содержащих сведения о специалистах-кокцидиологах, работающих или работавших в разных странах мира («Профили кокцидиологов», 1993, 1997).

В работе VII Международной конференции в Оксфорде от России (и б. СССР) принимал участие лишь один участник — Т. В. Бейер из Института цитологии

РАН в Санкт-Петербурге. Всего на конференции присутствовало более 300 человек из 37 стран мира, само перечисление которых представляет самостоятельный интерес: Австралия, Албания, Англия, Аргентина, Бельгия, Бразилия, Венгрия, Гана, Германия, Дания, Египет, Израиль, Индонезия, Ирландия, Испания, Италия, Канада, Кения, Китай, Колумбия, Малайзия, Мексика, Нидерланды, Нигерия, Польша, Россия, Саудовская Аравия, Сирия, Словацкая Республика, США, Танзания, Уганда, Франция, Чешская Республика, Швейцария, Швеция, Южная Африка, Япония.

Программа конференции включала одну гостевую вступительную лекцию, подводящую итоги развития науки об изучении кокцидий с начала XX века, т. е. со времени работ основоположника кокцидиологии Тиццера до наших дней. С такой лекцией выступил известный американский ученый-кокцидиолог проф. Томас Джефферс (T. Jeffers), акцентировавший внимание собравшихся на перспективах разработки методов борьбы с кокцидиозами в XXI веке.

На пленарных лекциях (их было 13) рассматривались ключевые проблемы современной кокцидиологии, как то: вопросы химиотерапии кокцидиозов, клеточные органеллы специального назначения, генетика и анализ геномов, цитокины и регуляция иммунитета. Специального внимания заслуживает сообщение Д. Рус (D. Roos, США) об обнаружении у ряда представителей типа Apicomplexa (*Eimeria*, *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis*, *Plasmodium*, *Theileria, Babesia*), кроме ядерной и митохондриальной ДНК, экстрахромосомной кольцевой ДНК размером 35 килобаз, соответствующей ДНК хлоропластов. Методом гибридизации in situ эта ДНК была локализована в передней части зоитов *T. gondii*, выше ядра, в области клеточной структуры, ранее известной как Гольджи-адъюнкт. По мнению авторов исследования, органелла, содержащая хлоропластную ДНК и названная ими «апикопласт», могла возникнуть у изученных паразитических простейших в результате вторичного эндосимбиоза. Эти данные широко используются для построения филогенетического древа типа Apicomplexa.

В докладе Т. В. Бейер и Н. В. Свежовой (Россия) критически обсуждалась возможная гомология между апикопластом и Гольджи-адъюнктом в клетках разных родов кокцидий. Признавая важность методов молекулярной биологии в построении филогенетических древ, авторы обосновали бесспорную кокцидийную природу криптоспоридий (род *Cryptosporidium*), основываясь на решающей роли такого признака, как жизненный цикл, рассматриваемый как сложный онтогенез паразита как вида.

Выступавший на той же секции д-р Моррисон (D. A. Morrison) из Австралии отстаивал тезис о некокцидийной природе криптоспоридий. Его сообщение было основано на анализе полных последовательностей 18S-рДНК для целого ряда эймериидных кокцидий родов *Besnoitia*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Eimeria*, *Hammondia*, *Isospora*, *Neospora*, *Sarcocystis*. Сравниваемые последовательности были выравнены при использовании стандартизированной модели вторичной структуры рДНК и проанализированы с помощью ряда современных методов (cladistic analysis, weighted parsimony, maximum likelyhood). В результате было показано, что группа эймериидных кокцидий является монофилетической, но только в том случае, если из нее исключить род *Cryptosporidium*, который рассматривается лишь как сестринская группа в рамках Sporozoa. Сам докладчик откровенно признал, что полученные им результаты отчетливо конфликтуют со всеми современными систематическими построениями в отношении кокцидий.

Вопросам систематики и филогении кокцидий было посвящено сообщение А. М. Тентер (A. M. Tenter) (Германия), основанное на результатах изучения кокцидий, ооцисты которых имеют изоспороидное построение. Докладчица поставила под сомнение достаточную валидность таких фенотипических признаков этих паразитических простейших, как жизненный цикл, формирование тканевых цист в промежуточном хозяине, а также морфология и локализация в хозяине разных эндогенных стадий развития. Решительно провозглашается новый взгляд на филогению живых организмов, основанный на данных молекулярной биологии, в первую очередь на основе изучения последовательностей 18S-ДНК. Заслуживают внимания выводы, сделанные д-ром Тентер. 1. Гомоксенные виды *Isospora* и гетероксенные виды *Toxoplasma gondii* и *Sarcocystis* spp. суть очень близкие организмы, образующие монофилетическую группу, четко отличающуюся от группы гомоксенных кокцидий родов *Eimeria* и *Cyclospora*, имеющих принципиально иную структуру ооцист. 2. Среди кокцидий с изоспороидной структурой ооцист различаются две группы: *а*) гомо- и гетероксенные виды *Isospora*, а также роды *Toxoplasma* и *Neospora*; *б*) виды рода *Sarcocystis*, среди которых в свою очередь различаются группы видов по признаку вида окончательного хозяина (кошка или собака). 3. Роды кокцидий с изоспороидной структурой ооцист объединяются в одно семейство, Isosporidae, тогда как роды с иной структурой ооцист включаются в другое семейство, рассматриваемое как сестринское по отношению к сем. Isosporidae.

Возможным сценарием к эволюции изученных паразитов может служить допущение, что общий предок с изоспороидными ооцистами должен был быть гомоксенным и что видообразование происходило сначала у предков их хозяев, т. е. будущих окончательных хозяев. Разные типы гетероксенных жизненных циклов и образование тканевых цист в промежуточных хозяевах могло возникать независимо в разных линиях. Для тех же видов рода *Isospora*, которые сохранились как гомоксенные паразиты, эта черта жизненного цикла может рассматриваться как примитивная.

Мы подробно остановились на сообщениях по систематике и филогении кокцидий для того, чтобы показать, что применение самых современных молекулярно-биологических методов исследования скорее подтверждает ранее утвердившиеся представления по данной проблеме, нежели открывает что-то новое. Дело скорее в терминологической путанице, что наиболее ярко демонстрируется в случае непризнания кокцидийной природы криптоспоридий (см. Моррисон). Рассмотрение криптоспоридий в рамках сестринской группы по отношению к эймериидным кокцидиям, в рамках Sporozoa, означает лишь то, что род *Cryptosporidium* включается в другую группу кокцидий. В самом деле, трудно предположить, что увлечение методами молекулярной биологии могло привести д-ра Моррисона и его коллег к признанию криптоспоридий как группы грегарин, ибо, находясь в рамках Sporozoa, организм может быть либо кокцидией, либо грегариной; третьего не дано!

В ряде других аспектов изучения кокцидий методы молекулярной биологии позволяют получать новую, полезную информацию. Так, в докладе А. Хекет, А. М. Тентер (A. Hecketh, A. M. Tenter, Германия) использовали методы гнездовой полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанной на анализе 18S-ДНК, в качестве удобного теста для диагностики *Sarcocystis* на ранней фазе развития острого саркоцистоза у овец. При этом материал для исследования получается достаточно просто: из крови животных.

На основе анализа последовательностей 16S-рРНК, амплифицированных с помощью ПЦР, были построены эволюционные древа для ряда цистообразующих кокцидий (O. J. M. Holmdahl, J. T. Ellis, P. A. W. Harper, D. A. Morrison, Австралия). Оказалось, что *Besnoitia besnoiti* является сестринским таксоном по отношению к *Neospora caninum* и *Toxoplasma gondii*, а также что все эти таксоны образуют монофилетическую группу с кокцидиями рода *Isospora*.

В ряде сообщений были представлены данные о характере паразито-хозяинных отношений при кокцидиозе. Представляет интерес наблюдение проникновения и персистирования в течение короткого времени спорозоитов кишечных кокцидий (*Eimeria tenella*) в клетках иных, чем энтероциты (A. P. Bland, Англия). В докладе д-ра Энтцерота (R. Entzeroth, Германия) было показано, что структура и функция паразитофорной вакуоли может регулироваться самим паразитом через посредство компонентов, секретируемых паразитом во время проникновения и после внедрения в клетку хозяина. Флуоресцентные маркеры были микроинъецированы в цитоплазму клетки хозяина, зараженного *Eimeria nieschultzi*. Оказалось, что в просвет паразитофорной вакуоли могут проходить молекулы размером до 1000 Да.

Заражение клеток хозяина кишечными кокцидиями *Cryptosporidium parvum* и *Eimeria tenella* было проанализировано в аспекте влияния на этот процесс клеточного цикла клетки макроорганизма (S. M. A. Brown, V. McDonald, G. H. Goombs, Англия). В опытах были использованы как синхронизированные, так и несинхронизированные клетки МДВК в культуре. Полученные результаты наводят на мысль о влиянии стадии клеточного цикла на способность паразита инвазировать такие клетки.

Английские исследователи (C. A. King, D. Bruce) сообщили о наличии у *Eimeria tenella* актомиозинового комплекса и его участии в процессе эксцистирования спорозоитов из спороцист после растворения пробки в микропиле (тельца Штида). Используя собственную систему актомиозина, спорозоиты способны приобретать определенную пространственную ориентацию внутри спороцисты, располагаясь апикальным полюсом по отношению к переднему краю апикальной поры. К этой же серии исследований можно отнести данные по изучению структурной и молекулярной организации микротрубочек и актинового цитоскелета у эймерий (M. Brown, E. C. A. Paul, Англия). Удалось выявить различия в архитектуре цитоскелета и микротрубочек у спорозоитов, с одной стороны, и мерозоитов 1-й и 2-й генерации — с другой. Продемонстрированы различия дифференциальной экспрессии α- и β-тубулинов на уровне белков и иРНК в спорулированных и неспорулированных ооцистах *E. tenella*.

В докладе д-ра Томли (F. M. Tomley, K. J. Billington, J. M. Bumstead, Англия) были проанализированы успехи в изучении одной из апикальных органелл — микронем. С помощью иммунологических методов было показано, что белки микронем секретируются очень рано в процессе заражения клетки, когда паразит только начинал контактировать с нею. Методом генного секвенирования было показано, что белки микронем содержат домены, участвующие в процессе адгезии паразита. Путем мечения специфических антител удалось показать, что белки микронем исходно локализуются на апикальном полюсе спорозоита *Eimeria tenella*, а затем меняют свое расположение в клетке и подвергаются экзоцитозу (наблюдение в условиях культуры клеток); такие белки выявлялись даже на поверхности некоторых зараженных клеток.

Вопросам иммунитета при кокцидиозах было посвящено сообщение американских исследователей (H. S. Lillehoj, K. D. Choi, P. Allen). В опытах in vitro было показано, что спорозоиты и мерозоиты эймерий способны выделять высокие уровни гамма-глобулина. В специальной серии опытов был получен рекомбинантный птичий гамма-глобулин, способный активизировать потенциальные макрофаги и подавлять внутриклеточное развитие *E. tenella* в культуральных клетках. Это свидетельствует об участии цитокинов в регуляции имунного ответа хозяина на заражение эймериями.

Представленная выборочная информация о научной программе конференции отнюдь не претендует на полноту освещения ее работы, но дает общее представление о направленности научной дискуссии кокцидиологов 1997 г.

Организационная сторона конференции была выполнена безукоризненно. Все участники совещания получили том тезисов конференции, а также целый ряд других полезных изданий по специальности. Вопрос о месте следующей конференции (уже в XXI веке) решен еще неокончательно, хотя, вероятнее всего, это будет Сидней, Австралия.

Санкт-Петербург *Т. В. Бейер*